

Elucidation of morphogenetic defects caused by disruption of the processing protease (kexB) gene in *Aspergillus oryzae* (**麹菌プロセッシングプロテアーゼ (KexB) 欠損株が示す形態形成異常の解明**)

著者	水谷 治
号	819
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10097/15999

氏 名(本籍)	みず 水	たに 谷	おさむ 治
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)		
学 位 記 番 号	農 博 第 8 1 9 号		
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	Elucidation of morphogenetic defects caused by disruption of the processing protease (<i>kexB</i>) gene in <i>Aspergillus oryzae</i> (麹菌プロセッシングプロテアーゼ (KexB) 欠損株が示 す形態形成異常の解明)		
論文審査委員	(主 査)	教 授	中 島 佑
	(副 査)	教 授	五 味 勝 也
		教 授	西 森 克 彦
		助教授	阿 部 敬 悦

論文内容要旨

序論

麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、我が国において古来より清酒、味噌、醤油等の発酵食品の製造に利用され、国際的にも GRAS (generally regarded as safe) として安全性が広く認知されている数少ない産業微生物である。この様に産業上での高い重要性にもかかわらず、麹菌では有性生活環が発見されておらず、交配による古典的な遺伝解析が行えないため、また、菌糸及び分生子が多核であり変異体の取得が困難であったことから、遺伝学的、細胞学的研究はほとんど行われていなかった。しかし 1980 年代後半に、麹菌をターゲットとした遺伝子工学的手法が確立されて以降、麹菌の多様な生命現象が分子レベルで精力的に解析されている。なかでも麹菌菌体とその生産物の安全性が極めて高いこと、菌体外に多量の酵素タンパク質を分泌生産する能力を持つことなどから、麹菌は大腸菌や酵母に代わる異種タンパク質生産のための宿主として期待され、数多くの研究がなされている。しかしながら、麹菌におけるタンパク質分泌機構、プロセッシング機構に関する研究はほとんどなされていない。

糸状菌細胞の中で細胞外、各オルガネラ、細胞膜、細胞壁などに局在する機能性タンパク質は、機能を持たない前駆体タンパク質として生合成され、Golgi body を経てプロセッシング酵素によって成熟型に変換され、機能を持つ形となって目的の位置へ局在することになる。この過程は、酵母から哺乳類までよく保存されている機構で、ペプチドホルモンや神経ペプチドなどの生理活性ペプチドや、血清タンパク質、細胞増殖因子など多くの分泌タンパク質の例が示されている。多くの場合、前駆体タンパク質はそれ自身では生理活性を持たず、細胞内プロセッシングを受けて初めて活性化されることから、プロセッシングの過程はタンパク質分泌のみならず、多様な生物機能の発現と調節において、非常に重要な位置を占めていると考えられる。

以上のことから、プロセッシング機構の解明は、タンパク質分泌機構の解明と共に生物機能の発現と調節を理解する手掛かりとなる。サチライシン様セリンプロテアーゼ kexin は、この細胞内プロセッシング機構の中心的役割を果たす酵素の一つと考えられている。kexin は、塩基性アミノ酸対部位 C 末端側で限定切断するプロテアーゼで、トランスゴルジ膜上に膜一回貫通型

として局在する膜タンパク質である。*kexin* は、酵母でその存在がみつかって以来、哺乳類をはじめとする多くの生物で発見され、報告されている。そこで、本博士論文研究ではこの機構のキープロテインとして存在する麴菌の *kexin* に注目した。麴菌 *Kexin* は、本研究室野島によりクローニングされ、*kexB* と名付けられている。本研究では、*KexB* の菌体内における機能と共に、*KexB* が麴菌の生命活動に与える影響を解明する目的で、*kexB* 遺伝子破壊株を造成し、その破壊株の解析を行った。

(本要旨において、特に断りのない限り、*kexB* や *KEX2* は遺伝子、*KexB* や *Kex2p* はタンパク質を意味する。)

第 1 章 *kexB* 遺伝子破壊株の造成と表現型解析

本章では、*kexB* 遺伝子の麴菌における生体内機能を調べるために、染色体上の *kexB* 遺伝子部位への相同組換えによる遺伝子破壊株の造成を行い、その表現型解析を行った。

選択マーカーとしてピリチアミン耐性遺伝子 (*ptrA*) を搭載した破壊用プラスミド (Fig.1A) を用いて形質転換を行った。得られた形質転換体では、染色体上に 2 コピーの N 末端領域及び C 末端領域が欠けた不完全遺伝子が生じることになるため、いずれも機能しない (Fig.1B)。形質転換体、約 400 株からコロニー PCR を用いて *kexB* 遺伝子破壊候補株をスクリーニングした。得られた候補株から、ゲノムを取得し、サザンブロッティングにより *kexB* 遺伝子破壊の確認を行った (Fig. 1C)。得られた遺伝子破壊株を $\Delta kexB$ と名付けた。

$\Delta kexB$ 株の表現型は、最少寒天培地 (CD plate) 培養において、野生株と比較して分生子形成能が著しく低下し、かつ小さく、密なコロニーを形成する表現型を示した (Fig. 2A)。また、走査型電子顕微鏡を用いた詳細な観察から、 $\Delta kexB$ 株の菌糸は野生株と比較して、枝分れが多く高密度に凝集し、菌糸先端は多分岐な形態を示していた (Fig. 2D to G)。興味深いことに、 $\Delta kexB$ 株の表現型は高浸透圧下で、その表現型が復帰する事が明らかになった (Fig. 3A)。走査型電子顕微鏡を用いた観察からも $\Delta kexB$ 株は野生株とほぼ同様の

分生子形成、菌糸形態を示していることが明らかになった (Fig. 3C to F)。さらに、液体培養下においても $\Delta kexB$ 株は、野生株と比較して、多分岐な形態を示した。しかし、高浸透圧条件下の液体培養では、野生株と同様の表現型に復帰していた (Fig. 4)。これらの表現型が本当に *kexB* 遺伝子破壊に由来するものなのかを確認するために、 $\Delta kexB$ 株に *kexB* 遺伝子を導入したところ、表現型が復帰した。よって、上記の表現型は *kexB* に由来していることが証明された (Fig. 5)。

第 2 章 *kexB* 遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析

麹菌の *kexB* 遺伝子破壊株は、顕著な表現型の変化を示した。*A. niger* や *A. nidulans* の *kexB* 遺伝子破壊株も、分生子形成能の低下は見られないものの菌糸が短く、多分岐な表現型を示す。また近年、二形性の *Candida albicans* おいて *KEX2* 遺伝子破壊株が菌糸体を形成できないといった表現型の報告がなされている。この様にプロセッシングプロテアーゼの破壊は、生命活動、特に形態形成に密接に関わっていると考えられる。しかしながら、なぜ *KexB* 欠損が、このような形態変化を引き起こすかは明らかにされていない。そこで、本研究では麹菌 *kexB* 遺伝子破壊株を用いて、トランスクリプトーム解析を行い、破壊株内でどのような変化が起きているかを考察した。

最も顕著な表現型を示した最少寒天培地培養において、 $\Delta kexB$ 株及び野生株から mRNA を取得し、 $\Delta kexB$ 株と野生株の浸透圧の存在下、非存在下での遺伝子の転写の様子を DNA マイクロアレイを用いて解析した。その結果、通常的环境条件下では、*kexB* 遺伝子破壊株の遺伝子発現、発現種が野生株と比較して非常に多いことを明らかにした。よって、通常条件下において、*kexB* 遺伝子破壊は、大規模な遺伝子発現を促すことが示唆された。一方で、高浸透圧条件下では *kexB* 遺伝子破壊株、野生株共に、遺伝子発現量、発現種が同等となることが明らかになった (Table 1)。 $\Delta kexB$ 株は顕著な形態異常を示すことから、マイクロアレイチップに搭載されている遺伝子群の中から、細胞壁合成に関与する遺伝子に焦点を当て、その遺伝子発現強度を解析した。その結果、*kexB* 遺伝子破壊は、キチン合成酵素である *chsB*,

chsC や β グルカン転移酵素である *gelB* といった細胞壁合成酵素群の異常発現を引き起こすことが明らかになった (Fig. 6A)。しかし高浸透圧条件下では、これらの発現は、野生株と同等レベルになることが明らかになった。(Fig. 6B)。このような細胞壁合成酵素の転写異常、及び高浸透圧により抑制される現象から、KexB 欠損は cell integrity シグナル伝達経路に異常をきたしているのではないかと仮説を立てた。

cell integrity シグナル伝達経路は、酵母でよく研究されており、低浸透圧、高温、細胞壁損傷などのストレスにより活性化し、Rho1, Pkc1 を経由して MAPK カスケードを活性化し、Rlm1 などの転写因子を活性化する経路である (Fig. 7)。この経路に制御されている遺伝子には、この経路の MAPK (mitogen-activated protein kinase) である *MPK1* やグルカン合成酵素の *FKS2*, キチン合成酵素 *CHS3* などの報告がある。この経路の異常が $\Delta kexB$ 株の *chsB*, *chsC*, *gelB* の発現異常を引き起こしているのではないかと考え、これらの遺伝子とこの経路の MAPK である *mpkA* の発現解析を行った (Fig. 8B)。その結果、*kexB* 遺伝子破壊株における *chsB*, *chsC*, *gelB* は野生株と比較してどの時間帯においても高発現していることが明らかになった。さらに、*mpkA* も野生株と比較して同様に高発現していた。また、酵母において cell integrity pathway は高浸透圧によって抑制される事が知られている。そこで、*mpkA* の転写異常が、浸透圧を感知することで形態形成の復帰と共に、野生株レベルまでに転写量が減少するかを確認した、その結果、有意に転写量が減少することが明らかになった (Fig. 8C)。これらの結果から、*kexB* 遺伝子破壊は cell integrity シグナル伝達経路に異常をもたらすことが間接的に示唆された。

KexB 欠損が cell integrity pathway を構成的に活性化しているかどうかを直接的に証明するために、この経路の MAPK である MpkA のリン酸化を phospho-p44/42 MAP kinase 抗体を用いて検出することを試みた (Fig. 9)。その結果、 $\Delta kexB$ 株は最少寒天培養において、有意に MpkA のリン酸化が確認された (Fig. 9A lanes 1 and 2)。一方、高浸透圧条件下では、 $\Delta kexB$ 株は表現型の復帰と共に MpkA のリン酸化は抑制されていた (Fig. 9A lanes 5 and 6)。野生株では、浸透圧の有無に関わらず、MpkA のリン酸化は確認されなかった (Fig. 9A lanes 3, 4, 7 and 8)。しかし、野生株も低浸透圧下に曝される

と MpkA のリン酸化が確認された (Fig. 9A lanes 9 and 10)。さらに、50, 70, 105 の各時間において、 $\Delta kexB$ 株と野生株との MpkA のリン酸化を調べたところ、野生株と比較して $\Delta kexB$ 株は有意にどの時間帯においても MpkA がリン酸化されていた (Fig. 9B)。これらの結果から、KexB 欠損は cell integrity シグナル伝達経路の構成的活性化を引き起こすことが明らかになった。

第 3 章 *kexB* 遺伝子破壊株の細胞壁解析

上記までの結果から、 $\Delta kexB$ 株が示す形態異常の原因の一つに cell integrity シグナル伝達経路の構成的活性化が考えられた。また、この経路は細胞壁の統合性に関与する経路である。そこで、KexB 欠損が麹菌の細胞壁合成にどのような影響を与えているかを調べるために、 $\Delta kexB$ 株の細胞壁組成、化学構造解析を試みた。糸状菌の細胞壁は、glucose のポリマーである β -1,3-glucan を主鎖とし、その主鎖に β -1,6- 結合で β -1,3-glucan の側鎖が結合している。また、その側鎖に *N*-acetylglucosamine のポリマーである chitin, mannose と galactofuranose で構成される galactomannan さらに β -1,3/1-4 glucan 等が結合し、細胞壁の 3 次元構造を形成していると考えられている。

まず、 $\Delta kexB$ 株の細胞壁構成糖の定量を行った。浸透圧非存在下、存在下で培養した $\Delta kexB$ 株及び野生株から細胞壁を調整し、酸加水分解により細胞壁構成糖であるグルコース、グルコサミン、マンノース、ガラクトフラノース量を定量した。その結果、通常条件下で、 $\Delta kexB$ 株は野生株と比較して β -glucan 含量が約半分に減少し、chitin 含量が約 1.5 倍に増加していることが明らかになった (Table 2)。浸透圧存在下では、 $\Delta kexB$ 株は野生株と比較して、どの構成糖もほぼ同等の値であったことから、 $\Delta kexB$ 株の浸透圧による表現型復帰は、細胞壁レベルでも起こっていることが示唆された。

$\Delta kexB$ 株の通常条件下における β -glucan 含量、chitin 含量の変化がその活性にまで影響を及ぼしているかを調べるために、 $\Delta kexB$ 株及び野生株の膜画分を取得し各々の活性測定を行った。その結果、chitin 合成酵素は $\Delta kexB$

株で有意に高い活性を示していた (Fig. 10)。また、 β -glucan 合成酵素では、培養初期の段階において $\Delta kexB$ 株は、野生株と比較して低い活性を示していた (Fig. 11)。

$\Delta kexB$ 株の細胞壁構造解析を行うために、細胞壁のアルカリ抽出を行った。 $\Delta kexB$ 株及び野生株の菌体を熱水抽出後、アルカリ抽出によりアルカリ可溶画分とアルカリ不溶画分とに分けた。その結果、 $\Delta kexB$ 株の細胞壁は、アルカリに可溶な画分が野生株と比較して非常に少ないことが明らかになった (Fig. 12)。また、アルカリ不溶画分に含まれるキチン含量を測定したところ、 $\Delta kexB$ 株は構成糖定量の結果と同様に、野生株よりキチン含量が高いことが明らかになった。さらに、アルカリ不溶画分に対して $\Delta kexB$ 株細胞壁の主鎖 β -1,3-glucan に対しての側鎖の割合を調べるために、メチル化分析を行った。その結果、 $\Delta kexB$ 株は、野生株より β -1,6- 結合の割合が少ないことが示唆された (Table 3)。

総合考察

(1) *kexB* 遺伝子破壊株の造成と表現型解析

麹菌 (*A. oryzae*) の *kexB* 遺伝子破壊株は分生子形成能の低下及び顕著な形態形成異常を示した。*A. niger* や *A. nidulans* の *kexB* 遺伝子破壊株の表現型と比較すると麹菌の破壊株の方がより重篤な表現型を示すことから、麹菌 KexB の機能は形態形成や分化により重要であることが示唆される。しかし、各 KexB の基質特異性は非常に似ていることから、KexB の機能の違いではなく、KexB の基質の違いが表現型の変化に起因していると考えられる。また、高浸透圧による表現型の復帰は、他の真菌 (*S. cerevisiae*, *C. albicans*) では報告がなく、興味深い現象である。この表現型の復帰に関して、二つの仮説を以下に示す。一つ目として、高浸透圧ストレスによって誘導されるサプレッサーの存在。二つ目としては、高浸透圧下では、cell integrity シグナル伝達経路が不活性化し、高浸透圧によって活性化されるシグナル伝達経路の応答因子が表現型の復帰に関与している可能性が挙げられる。現在、

共同研究者と共に表現型復帰因子について研究を進めている。

(2) *kexB* 遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析

kexB 遺伝子破壊は、cell integrity シグナル伝達経路の構成的活性化を引き起こすことが明らかになった。この経路の構成的活性化株の発見は *Aspergillus* 属では、世界で初めてのものである。ここで、なぜ KexB の欠損がこの経路の構成的活性化を引き起こしたのかに対して、以下の仮説を提唱する。(i) KexB が細胞壁合成に必要な酵素のプロセッシングを行っており、これにより破壊株は正常な細胞壁を作ることが出来ない。この細胞壁の異常をセンサータンパク質がストレスと感じ、cell integrity pathway を活性化し、細胞壁損傷の補修に必要な細胞壁関連遺伝子群の転写量が増加する (Fig. 13)。酵母において、この経路のセンサータンパク質は、細胞壁の攪乱を直接感知して G protein 反応を経由して経路の活性化を引き起こしていることが知られている。また、このセンサータンパク質のカウンターパートが麹菌ゲノム内にも存在することを確認している。(ii) KexB が cell integrity pathway のセンサータンパク質のプロセッシングを行っており、不活性化型のセンサータンパク質が negative regulator として働き、この経路の構成的活性化を引き起こす (Fig. 13)。 *C. albicans* のゲノム情報を用いた Kex2p 基質予測から、cell integrity pathway のセンサータンパク質である Wsc2p ホモログが候補に挙がっている。このことからも麹菌 KexB がセンサータンパク質を基質にしている可能性が考えられる。上記の仮説の他に、他のシグナル伝達経路の影響などや細胞壁合成酵素とセンサータンパク質の両方を KexB が基質にしている可能性も考えられる。

(3) *kexB* 遺伝子破壊株の細胞壁解析

KexB の欠損は cell integrity pathway の構成的活性化を引き起こすことから、 $\Delta kexB$ 株の細胞壁解析は、KexB が関与する細胞壁合成酵素の予測と共に、この経路の応答反応を細胞壁レベルで理解することが出来ると考えられる。 $\Delta kexB$ 株の細胞壁構成糖は、野生株と比較して β グルカン含量が半

分程度まで減少していた。糸状菌を含む真菌類の多くは、 β グルカン为主要な構成糖として細胞壁を構築している。また、*Aspergillus* 属は、 β グルカン合成酵素 (FksA) を一つしか持たず、その遺伝子破壊は致死を示す。このことから、 $\Delta kexB$ 株細胞壁の β グルカンの減少は、細胞壁強度を非常に危ういものにしていると考えられる。この減少の原因として、 $\Delta kexB$ 株の生育初期 (50 h) に FksA の活性が低い、又は、タンパク量が少ないことが活性測定の結果から、示唆された。 β グルカン合成には、活性サブユニットと調節サブユニット及び GTP の供給が必要である。 $\Delta kexB$ 株の生育初期にはこれらのバランスがうまく機能していない可能性が考えられる。

細胞壁のアルカリ抽出の結果から、 $\Delta kexB$ 株は細胞壁表層及び分岐先端の β グルカンが少ないことが示唆された。また、アルカリ不溶画分に含まれるキチン含量が野生株と比較して多いことから、主鎖となる β -1,3-glucan に多くのキチンが結合している可能性が示唆された。さらに、メチル化分析の結果より $\Delta kexB$ 株の細胞壁主鎖である β -1,3-glucan の分岐度が野生株より少ないことが示唆された。以上の結果より、 $\Delta kexB$ 株細胞壁構造は、「主鎖 β -1,3-glucan の分岐が少なく、分岐先端の短い側鎖グルカンに、その空間を埋めるような形で、多くのキチンが結合している」といった構造モデルを提唱した (Fig. 14)。

要約

- 1) 麹菌 *kexB* 遺伝子破壊株の表現型は、形態形成異常を示し、その表現型は高浸透圧下で復帰することを見出した。
- 2) *kexB* 遺伝子破壊株の形態異常の原因の一つに、cell integrity シグナル伝達経路の構成的活性化が示唆された。また、高浸透圧における表現型の復帰は、この経路の抑制と平行な現象として起こっている事が明らかになった。
- 3) *kexB* 遺伝子破壊株は、 β グルカン合成の減少による細胞壁の物理的強度の低下を、キチン合成を増すことでその強度を補っていることが示唆された。

原著論文

Mizutani O., Nojima A., Yamamoto M., Furukawa K., Fujioka T., Yamagata Y., Abe K, and Nakajima T. (2004)

Disordered cell integrity signaling caused by disruption of the *kexB* gene in *Aspergillus oryzae*.

Eukaryotic Cell, Aug;3(4):1036-48.

Mizutani O., Shiina M., Watanabe T., Sano M., Machida M., Abe K, and Nakajima T.

Perturbation of cell wall caused by defect of the KexB in *Aspergillus oryzae*.

(Manuscript in preparation)

Mizutani O., Furukawa K., Ichiyanagi S., Tokuoka M., Gomi K., Abe K, and Nakajima T.

Study of the phenotype of the *kexB* gene disruptant in *Aspergilli* suppressed under high osmotic stress.

(Manuscript in preparation)

Fujioka T., Mizutani O., Furukawa K., Abe K, and Nakajima T.

Functional Analysis of *Aspergillus nidulans* *rlmA* gene encoding a transcription factor involved in cell wall integrity signaling.

(Manuscript in preparation)

参考論文

Maeda H., Mizutani O., Yamagata Y., Ichishima E., and Nakajima T. (2001)

Alkaline-Resistance Model of Subtilisin ALP I, a Novel Alkaline Subtilisin

Journal of Biochemistry, May;129(5):675-82.

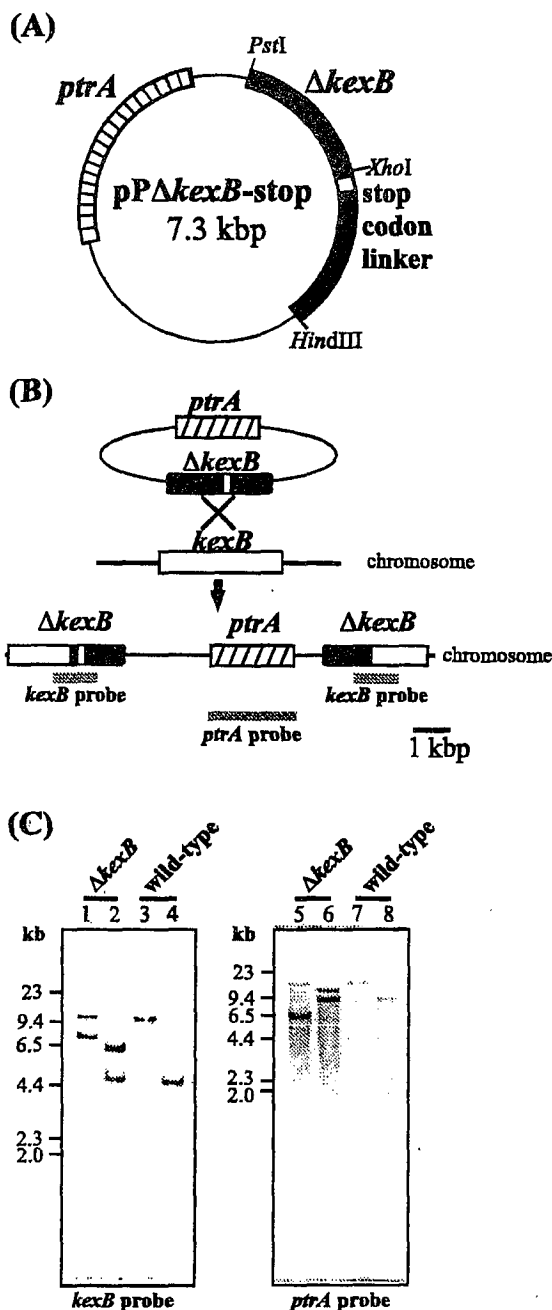


Figure 1. Generation of the *kexB* gene disruptant. (A) Construction of the plasmid for *kexB* gene disruption. The plasmid contains a truncated *kexB* gene and *ptrA*, which encodes a thiazole biosynthetic enzyme. The open box indicates a stop codon linker inserted in the *kexB* ORF. (B) Strategy for homologous recombination of *A. oryzae* for *kexB* gene disruption. The closed box indicates the *kexB* ORF with the stop codon linker. The gray bars indicate the hybridization positions of the probes to confirm gene disruption by Southern blot analysis. The upper bars indicate the *kexB* probe. The lower bar indicates the *ptrA* probe. (C) Southern blot analyses of the genomic DNA from transformant. Each lane contained 20 μ g of restriction enzyme-digested genomic DNA of the $\Delta kexB$ disruptant (lanes 1, 2, 5 and 6) and wild-type (lanes 3, 4, 7 and 8). The enzymes used were *Pst*I and *Sph*I (lanes 1 and 3), *Apa*LI and *Nsp*V (lanes 2 and 4), *Spe*I (lanes 5 and 7), and *Pst*I (lanes 6 and 8). Hybridization was performed with the *kexB* probe (see Materials and Methods; left) and the *ptrA* probe (right).

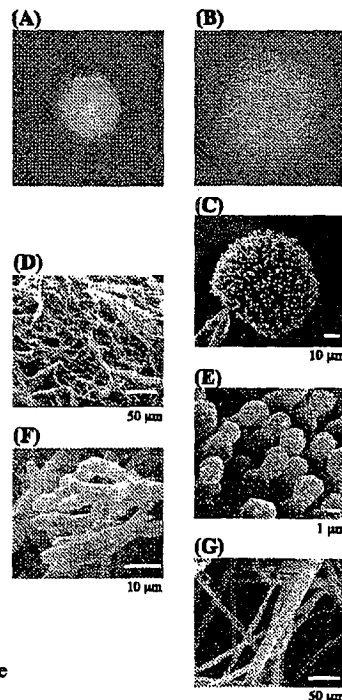


Figure 2. The morphological phenotypes of the $\Delta kexB$ strain on CD agar plates. $\Delta kexB$ (A, D, and F) and wild-type (B, C, E, and G) cells were cultivated on CD agar plates at 30°C for 4 days. A and B show the colony growth of $\Delta kexB$ and wild-type, respectively. C through G are scanning electron micrographs. Conidiophores and conidia of wild-type are shown (C and E, respectively); the $\Delta kexB$ strain did not form conidiophores or conidia. D and G show hyphae of the $\Delta kexB$ and wild-type strains, respectively. F shows the hyphal tips of the $\Delta kexB$ strain.

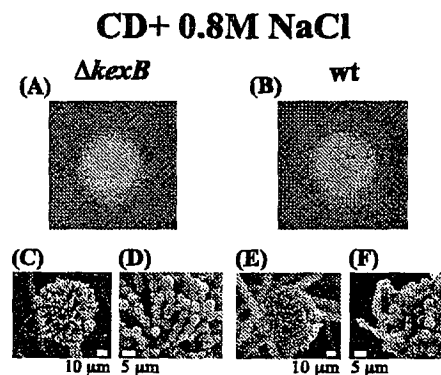


Figure 3. Restoration of the $\Delta kexB$ phenotypes on CD agar plates with high osmotic pressure. $\Delta kexB$ (A) and wild-type (B) strains were cultivated on CD agar containing 0.8 M NaCl at 30°C for 4 days. Conidiophores of $\Delta kexB$ and wild-type are shown in C and E, respectively. Conidia of $\Delta kexB$ and wild-type are shown in D and F, respectively.

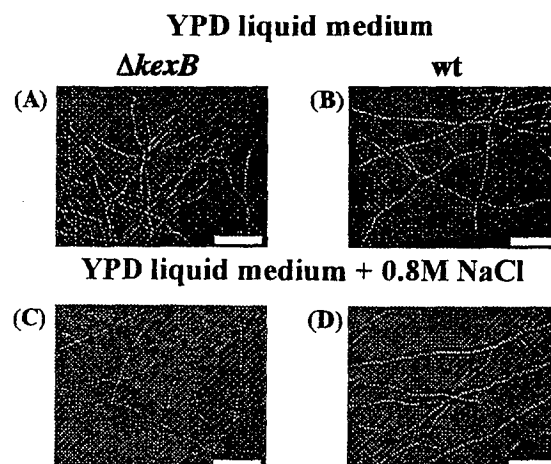


Figure 4. Phenotypes of *A. oryzae* $\Delta kexB$ in liquid culture medium. $\Delta kexB$ (A and C, respectively) and wild-type (B and D, respectively) strains were cultivated in YPD liquid medium (A and B, respectively) and plus 0.8 M NaCl (C and D, respectively) at 30°C for 22 h. Scale bar 50 μ m.

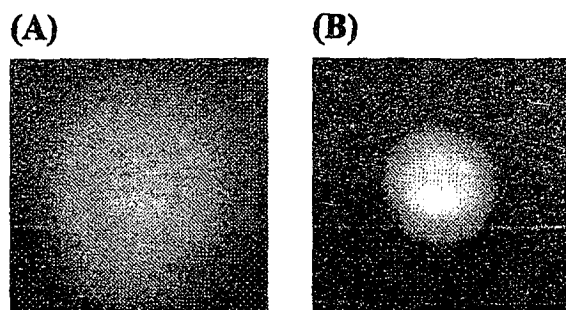


Figure 5. The morphological phenotypes of the $\Delta kexB$ strain transformed with the wild type *kexB* gene on CD agar plates.

The $\Delta kexBniaD^-$ strains transformed with the wild type *kexB* gene (A) and with pNGA142 vector (B) were cultivated on CD agar plates at 30°C for 4 days.

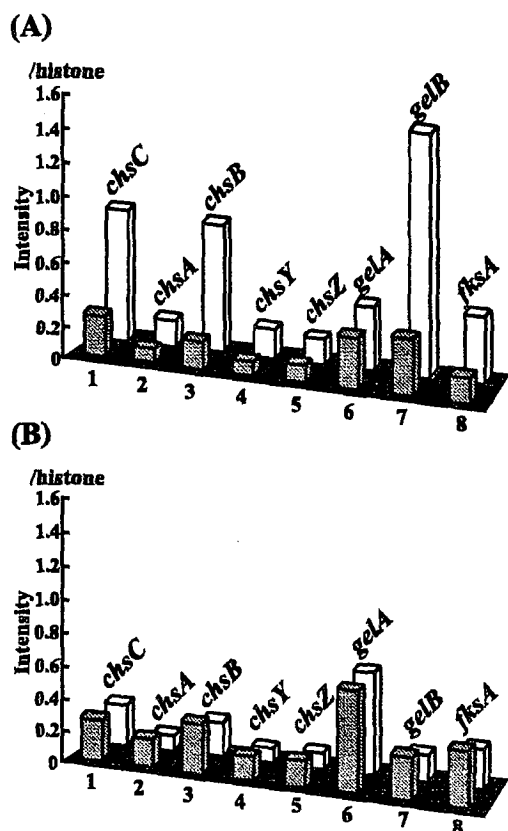


Figure 6. Expression levels of genes involved in cell wall biogenesis.

The bar graphs indicate the expression levels of the genes encoding cell wall synthesis-related proteins from wild-type and $\Delta kexB$ grown on CD agar plates (A) and CD agar plates containing 0.8 M NaCl (B). The gray and white bars indicate the relative intensities of transcription of the genes in the wild-type and $\Delta kexB$ strains, respectively, according to cDNA microarray analyses. The relative intensities for the examined genes were calculated using the intensity of histone H2B as an internal standard (1.0). The genes were: 1, *chsC* (chitin synthase C); 2, *chsA* (chitin synthase A); 3, *chsB* (chitin synthase B); 4, *chsY* (chitin synthase Y); 5, *chsZ* (chitin synthase Z); 6, *gela* (glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferase); 7, *gelB* (glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferase); 8, *fksA* (β -1,3-glucan synthesis).

Table 1. The number of the genes whose expression levels were altered by deletion of *kexB* in *A. oryzae*.

relative expression ratios ($\Delta kexB$ / wild-type)	CD	CD + 0.8 M NaCl
	gene number ^a	gene number ^a
> 4.0 fold	68	0
2.0 fold - 4.0 fold	291	25
0.5 fold - 2.0 fold	1087	1736
0.25 fold - 0.5 fold	48	1
< 0.25 fold	27	0

^a After three independent analyses, 1521 spots on the cDNA microarrays for CD plates and 1762 spots on the cDNA microarrays for CD plates with 0.8 M NaCl were statistically verified by using the Genomic profiler program.

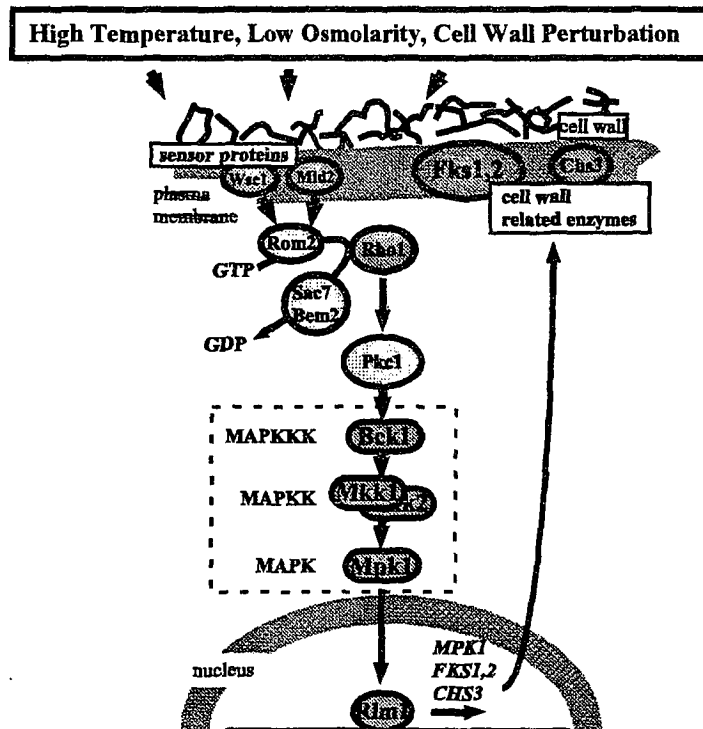


Figure 7. Outline of the cell integrity pathway of *S. cerevisiae*.

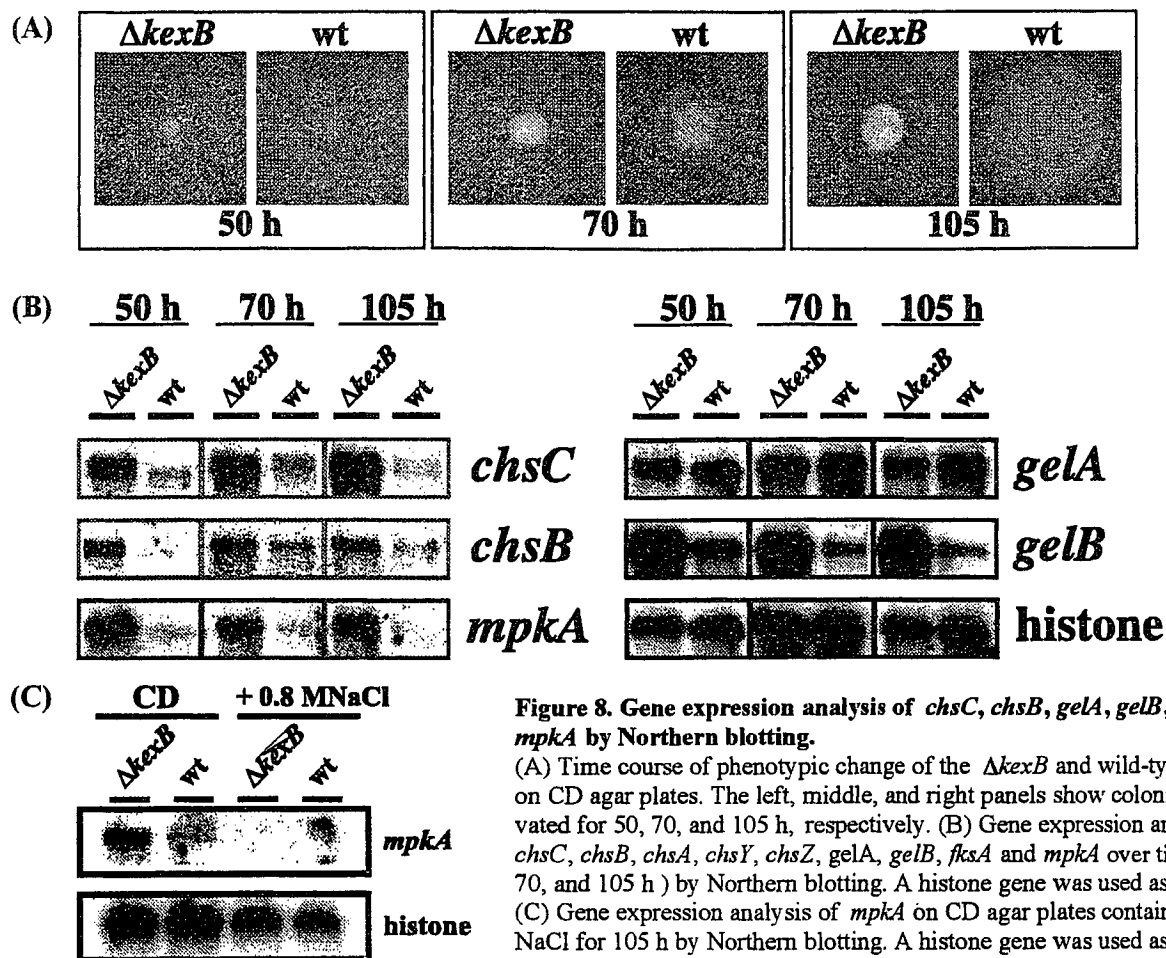


Figure 8. Gene expression analysis of *chsC*, *chsB*, *gelA*, *gelB*, and *mpkA* by Northern blotting.

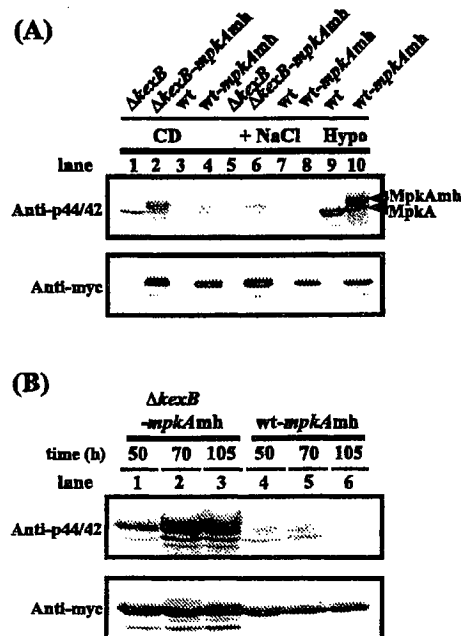
(A) Time course of phenotypic change of the $\Delta kexB$ and wild-type strains on CD agar plates. The left, middle, and right panels show colonies cultivated for 50, 70, and 105 h, respectively. (B) Gene expression analysis of *chsC*, *chsB*, *chsA*, *chsY*, *chsZ*, *gelA*, *gelB*, *fksA* and *mpkA* over time (50, 70, and 105 h) by Northern blotting. A histone gene was used as a control. (C) Gene expression analysis of *mpkA* on CD agar plates containing 0.8 M NaCl for 105 h by Northern blotting. A histone gene was used as a control.

Figure 9. The cell integrity pathway MAP kinase MpkA is constitutively phosphorylated in the *A. oryzae* $\Delta kexB$ strain on the CD plate.

Upper panels show immunoblotting with anti-phospho-p44/42 Map kinase antibodies (Anti-p44/42). Lower panels show immunoblotting with anti-Myc antibodies (Anti-myc). (A) $\Delta kexB$ (lane 1 and 5), $\Delta kexB$ with *mpkA*mh ($\Delta kexB$ -*mpkA*mh, lane 2 and 6), wild-type (wt, lane 3 and 7) and wild-type with *mpkA*mh (wt-*mpkA*mh, lane 4 and 8) strains were grown for 105 h at 30°C on the CD plate (CD) and CD plate with an osmolyte (+NaCl) before preparation of cell extracts (see Materials and Methods). As controls, wild-type (lane 9) and wt-*mpkA*mh (lane 10) cells were exposed for 1 h to a hypotonic condition (Hypo) by addition of water after cultivation for 50 h on the CD plate. (B) The $\Delta kexB$ -*mpkA*mh (lane 1, 2 and 3) and wt-*mpkA*mh (lane 4, 5 and 6) strains were grown at 30°C on the CD plate for 50, 70, and 105 h, respectively, before preparation of cell extracts.

Table 2 Sugar contents of cell wall fractions.

Hexose ($\mu\text{g}/\text{mgCW}$)	plate strain	CD		CD + 0.8M NaCl	
		$\Delta kexB$	RIB40	$\Delta kexB$	RIB40
Glucose		81.5 \pm 8.99	202 \pm 8.49	273 \pm 37.0	270 \pm 44.2
N-acetyl glucosamine		175 \pm 14.0	110 \pm 6.11	60.5 \pm 5.81	68.1 \pm 7.76
Mannose		12.3 \pm 1.23	12.9 \pm 0.72	5.05 \pm 0.53	7.75 \pm 0.51
Galactose		26.34 \pm 1.30	9.68 \pm 1.65	26.97 \pm 2.43	24.73 \pm 7.52



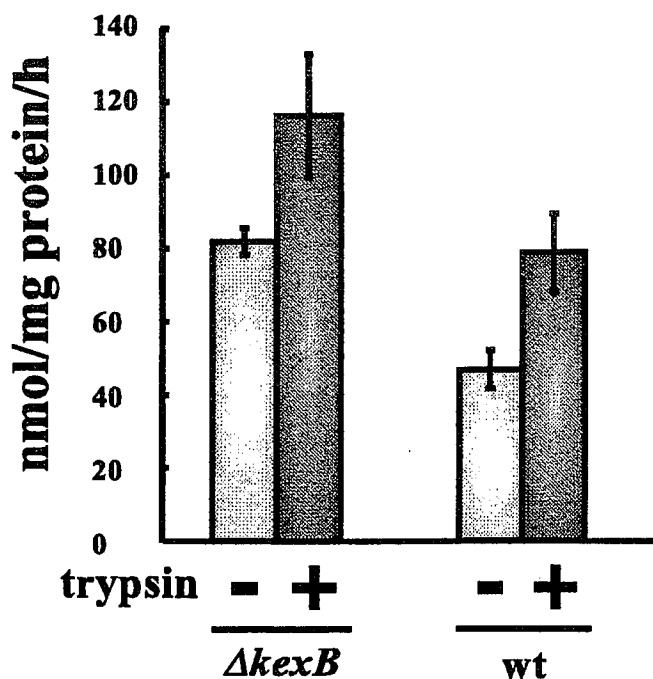


Figure 10. Comparison of chitin synthase activities in *ΔkexB* and wild-type strains cultivated on CD plate at 30°C for 105 h.

Membrane proteins were used for chitin synthase assay without trypsin digestion and with trypsin digestion. Minus signals indicate the membrane proteins are not treated by trypsin. Plus signals indicate the membrane proteins are treated by trypsin. Error bars indicate the standard deviation (n = 3).

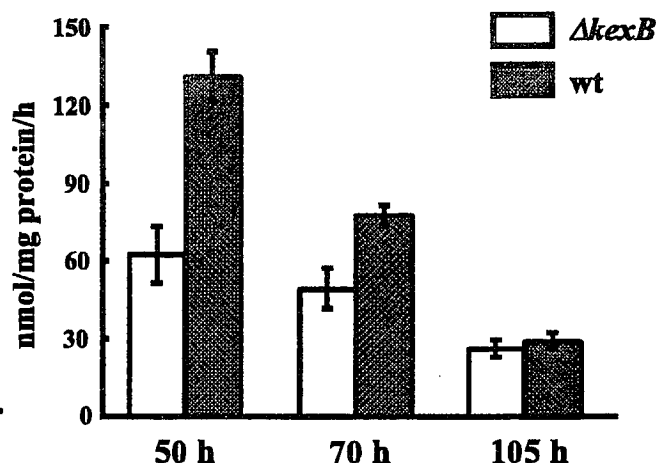


Figure 11. Comparison of β-1,3-glucan synthase activities in *ΔkexB* and wild-type strains on CD agar plates.

Membrane proteins were used for glucan synthase. 50 h, 70 h and 105 h indicated cultivated time of *ΔkexB* and wild-type strains on CD agar plates. Error bars indicate the standard deviation (n = 3).

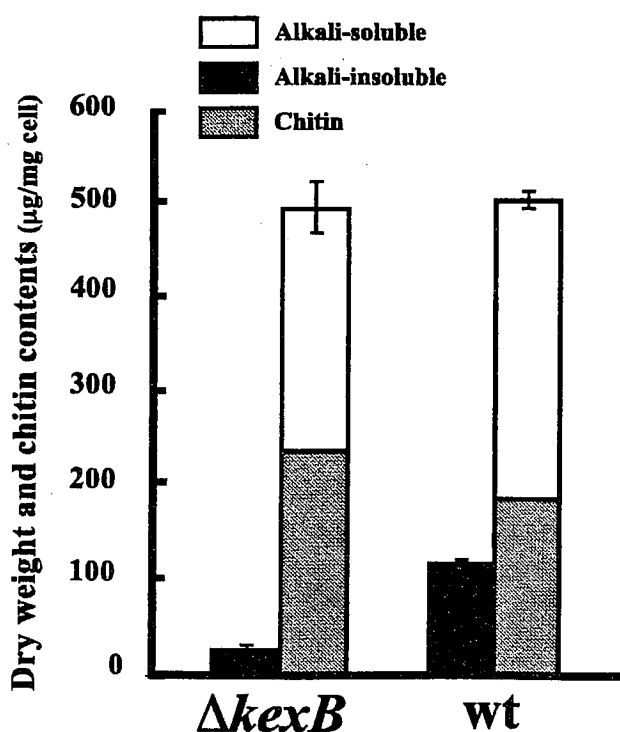


Figure 12. Ratio of Alkali-soluble to Alkali-insoluble in *ΔkexB* and wild type cells cultivated on CD plate at 30°C for 105 h.

The gray bars indicate *N*-acetylglucosamine content in alkali-insoluble fractions micrograms per milligram (dry weight) of cells. Error bars indicate the standard deviation (n = 3).

Table 3 Ratios of methyl ethers obtained after methanolysis of permethylated fractions from the most complex polysaccharide structure of the alkali-insoluble fraction of *A. oryzae ΔkexB*.

Alditol acetates ^a	Linkages	Molar ratios	
		<i>ΔkexB</i>	wild-type
2,3,4,6-Tetra-Me-Glc	G ₁	1.9	1.7
2,4,6-Tri-Me-Glc	3G ₁	19.6	16.6
2,4-Di-Me-Glc	3G ₁	1.0	1.0

^a 2,3,4,6-Tetra-Me-Glc = 2,3,4,6-Tetra-*O*-methyl-D-glucose, and so on.

ΔkexB : the β-1,3-glucan is a branched polymer with 5.1% of β-1,6 branch points.

wild-type : the β-1,3-glucan is a branched polymer with 6.0% of β-1,6 branch points.

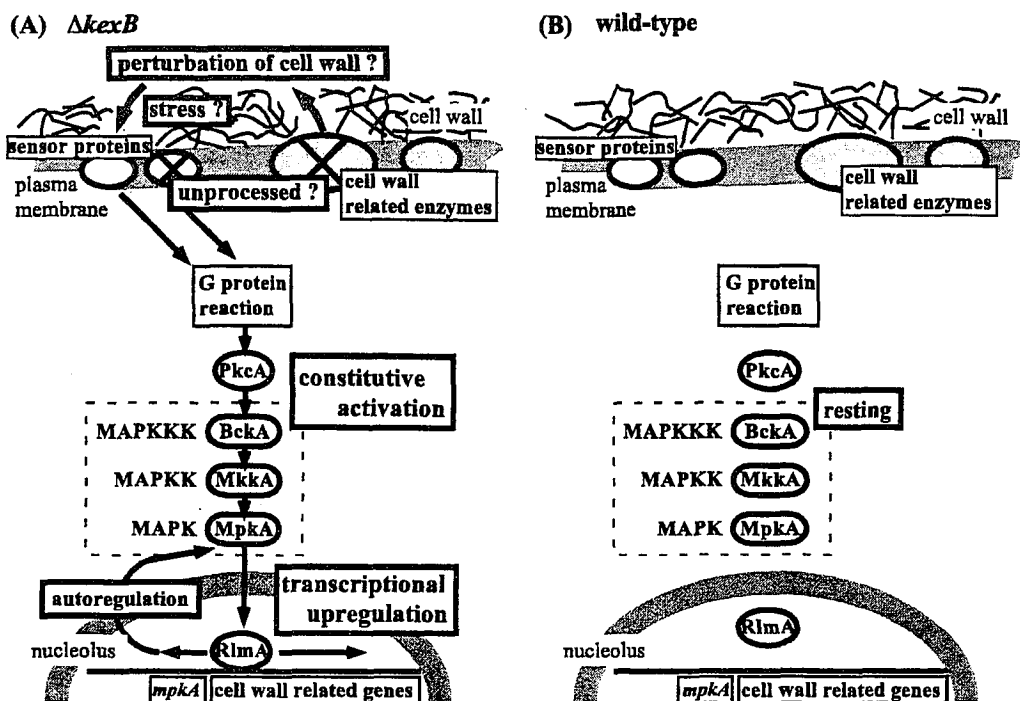


Figure 13. Schematic model for implication of the cell integrity pathway in the $\Delta kexB$ (A) and wild-type (B) strains. The cell integrity MAP kinase pathway is shown by the dotted box. *pkcA*, *mpkA*, and *rlmA* were isolated from *Aspergillus* fungi. The yeast *BCK1* and *MKK1* orthologs have not yet been isolated from *Aspergillus* species, however putative ORFs (*bckA*, *mkkA*) homologous to the two genes are found in *A. oryzae* genome sequences. The cell integrity pathway in the $\Delta kexB$ strain is constitutively activated (A), although the pathway is not activated (resting) unless the wild-type strain senses some stress like hypoosmolarity (B). *A. oryzae* KexB is predicted to be required for precise proteolytic processing of sensor proteins in the cell integrity pathway and/or of cell wall-related enzymes whose genes are under transcriptional control by the pathway.

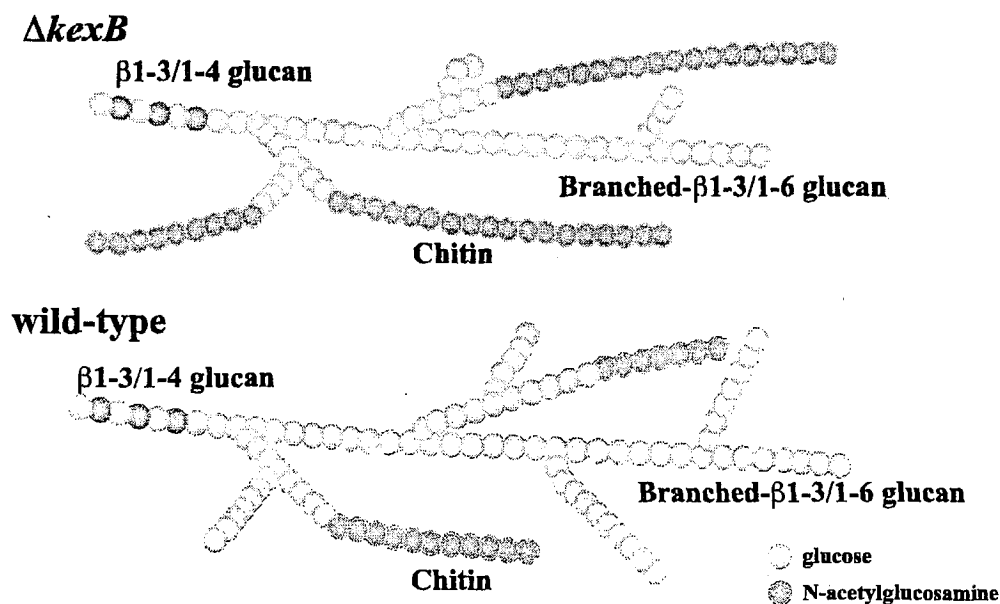


Figure 14. Tentative representation of the polysaccharide organization in the structural alkali-insoluble core of the *A. oryzae* $\Delta kexB$ cell wall.

論文審査結果要旨

真核細胞において、細胞外、各オルガネラ、細胞膜、細胞壁などに局在する機能性タンパク質は、はじめに機能をもたない前駆体タンパク質として生合成され、ゴルジ体を経てプロセシング酵素によって成熟型に変換され機能をもつ形となって目的の場所に局在する。

このように細胞内でおこる前駆体タンパクのプロセシングの過程は、タンパク質の分泌のみならず多様な生物機能の発現と調節において、重要な位置を占めている。サチライシン様セリンプロテアーゼ、ケクシン (kexin) は、この細胞内プロセシング機構の中心的役割をになう酵素の一つと考えられている。ケクシンは酵母でその存在が見出されて以来、哺乳類をはじめ多くの生物でその存在が知られている。

候補者の研究は、わが国の発酵産業で最も一般的に使用されている糸状菌である麹菌 (アスペルギルスオリゼ, *Aspergillus oryzae*) のケクシン (KexB) の菌体内における機能と、麹菌の生命活動に与える影響を解明する目的で、麹菌の KexB 遺伝子破壊株を造成し、その解析を行ったものである。

麹菌 KexB 遺伝子破壊株を取得しその表現型を解析した結果、分生子形成能の低下及び顕著な形態形成異常を示したことより、KexB の機能は麹菌の形態形成や分化に深く関係していることが示唆された。KexB 遺伝子破壊株の DNA マイクロアレイを用いた発現解析を行った結果、細胞形態構築 (cell integrity) にかかわるシグナル伝達経路の構成的活性化を引き起こしていることを見出した。KexB 破壊株が形態異常を示したことより糸状菌の形態維持を担っている細胞壁多糖、とくにベータグルカン、キチンの合成系に異常がある事が予想され、破壊株の遺伝子発現解析、酵素活性測定結果からも、ベータグルカン合成に関与する遺伝子 GelB, とキチン合成に関与する遺伝子 ChsB, ChsC が異常に増加していることが示された。細胞壁ベータグルカンの構造解析の結果から、KexB 遺伝子破壊株の形態異常の原因は、細胞壁骨格ベータグルカンの構造異常による細胞壁の物理的強度の低下によることを明らかにした。

以上候補者の研究は、麹菌アスペルギルス オリゼのプロセシングプロテアーゼ・ケクシン (KexB) の菌体内における機能が、細胞形態構築にかかわるシグナル伝達経路の構成的活性化を引き起こしていることを見出した。この発見はアスペルギルス属の糸状菌では世界ではじめてのものである。さらに細胞形態の異常は細胞壁骨格グルカンの構造変化によるものであることをはじめて化学的に証明した点で、審査員一同、候補者は博士 (農学) の学位を授与されるに充分の資格を有するものと認定した。